



**HAL**  
open science

## Génération de second harmonique optique par le collagène fibrillaire

Marie-Claire Schanne-Klein, Mathias Strupler

► **To cite this version:**

Marie-Claire Schanne-Klein, Mathias Strupler. Génération de second harmonique optique par le collagène fibrillaire. Images de la Physique, 2007, pp.81. hal-00821504

**HAL Id: hal-00821504**

**<https://polytechnique.hal.science/hal-00821504v1>**

Submitted on 19 Nov 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Génération de second harmonique optique par le collagène fibrillaire



Marie-Claire Schanne-Klein

marie-claire.schanne-klein@polytechnique.edu

Mathias Strupler

mathias.strupler@polytechnique.edu

Laboratoire d'optique et biosciences (LOB), UMR 7645, CNRS/École polytechnique/INSERM/ENSTA, Palaiseau

***Le collagène est la protéine la plus importante en poids chez les mammifères et joue un rôle essentiel dans l'assemblage des tissus biologiques. La technique de microscopie optique par génération de second harmonique permet d'imager l'architecture tridimensionnelle des fibres de collagène et de mesurer avec une excellente sensibilité l'accumulation de ces fibres dans certaines pathologies.***

Le collagène, famille de protéines présentant des domaines en triple hélice, s'organise selon diverses structures à l'extérieur des cellules, où elles constituent avec d'autres macromolécules ce qu'on appelle la matrice extracellulaire. On observe notamment des réseaux, formés par le collagène de type IV, ou des fibres, formées par le collagène de type I ou d'autres collagènes dits fibrillaires. Loin d'être un élément passif de l'assemblage des tissus biologiques, le collagène joue un rôle actif dans divers processus fondamentaux tels que les interactions cellulaires ou la réparation des tissus. En réponse à diverses agressions, il peut se former une fibrose, c'est-à-dire une accumulation de fibres de collagène, qui conduit dans la plupart des cas à un dysfonctionnement de l'organe atteint. Par exemple, une grande part des insuffisances rénales terminales provient d'une fibrose rénale consécutive à une hypertension artérielle et au stress mécanique engendré. Pour proposer et évaluer des approches thérapeutiques pertinentes, il est essentiel de caractériser l'architecture de ces fibroses collagéniques et de mesurer leur importance de manière sensible et reproductible. Cependant, les biologistes et les médecins se heurtent à des difficultés méthodologiques, car les techniques conventionnelles sont fortement invasives, peu quantitatives et sans résolution tridimensionnelle. De nouveaux outils sont ainsi nécessaires pour visualiser spécifiquement les collagènes fibrillaires.

Dans ce contexte, il est intéressant d'utiliser le signal intrinsèque de génération de second harmonique (SHG) par les collagènes fibrillaires. Il s'agit de la conversion d'une source laser intense impulsionnelle de fréquence  $\omega$  en son harmonique à  $2\omega$ , par diffusion de 2 photons à  $\omega$  en un seul photon à  $2\omega$ . Cette interaction de trois photons, décrite par un tenseur d'ordre trois, obéit aux règles de symétrie spécifiques de ces tenseurs, et en particulier requiert l'absence de centrosymétrie. Il s'agit de plus d'un processus dit cohérent où les différents champs harmoniques rayonnés par une distribution de molécules inter-

fèrent pour construire le signal macroscopique. L'intensité du signal est alors proportionnelle au carré de la densité des molécules générant la réponse harmonique. En pratique, la SHG est un processus efficace dans des macrostructures denses et ordonnées, ce qui est le cas des structures fibrillaires au plan biologique. Des signaux SHG ont ainsi été mis en évidence dès les années 80 dans le collagène fibrillaire par l'équipe de Freund à l'université de Jérusalem, et plus récemment dans les filaments épais des tissus musculaires et quelques autres macrostructures.

Ce signal SHG du collagène fibrillaire trouve tout son intérêt en microscopie multiphoton à balayage laser. Ce type de microscopie a été développé à l'origine par le groupe de W. Webb, à l'université Cornell (USA) sur la base de signaux de fluorescence excitée à deux photons (2PEF). Il s'agit d'une alternative à la microscopie confocale où la localisation tridimensionnelle du signal provient du fait que les signaux multiphotons dépendent quadratiquement de l'intensité d'excitation. Les principaux avantages de la microscopie multiphoton résident dans l'absence de dommages optiques hors du point focal, dans sa robustesse par rapport aux phénomènes de diffusion, ce qui permet d'imager des tissus biologiques à des profondeurs inégalées en microscopie confocale, et dans la richesse des phénomènes optiques non-linéaires observables (fluorescence excitée à 2 photons, génération de second et troisième harmoniques, diffusion Raman anti-Stokes cohérente...). Ces aspects ont été développés dans un article précédent proposé par J. Mertz, qui a notamment mis en évidence les effets de cohérence en microscopie SHG pour visualiser des membranes cellulaires (*Image de la physique 2005*, pages 159-165).

Dans cet article, nous nous concentrerons sur la visualisation des collagènes fibrillaires et, plus généralement, de la matrice extracellulaire. Il s'agit aujourd'hui d'une des applications les plus prometteuses de la microscopie



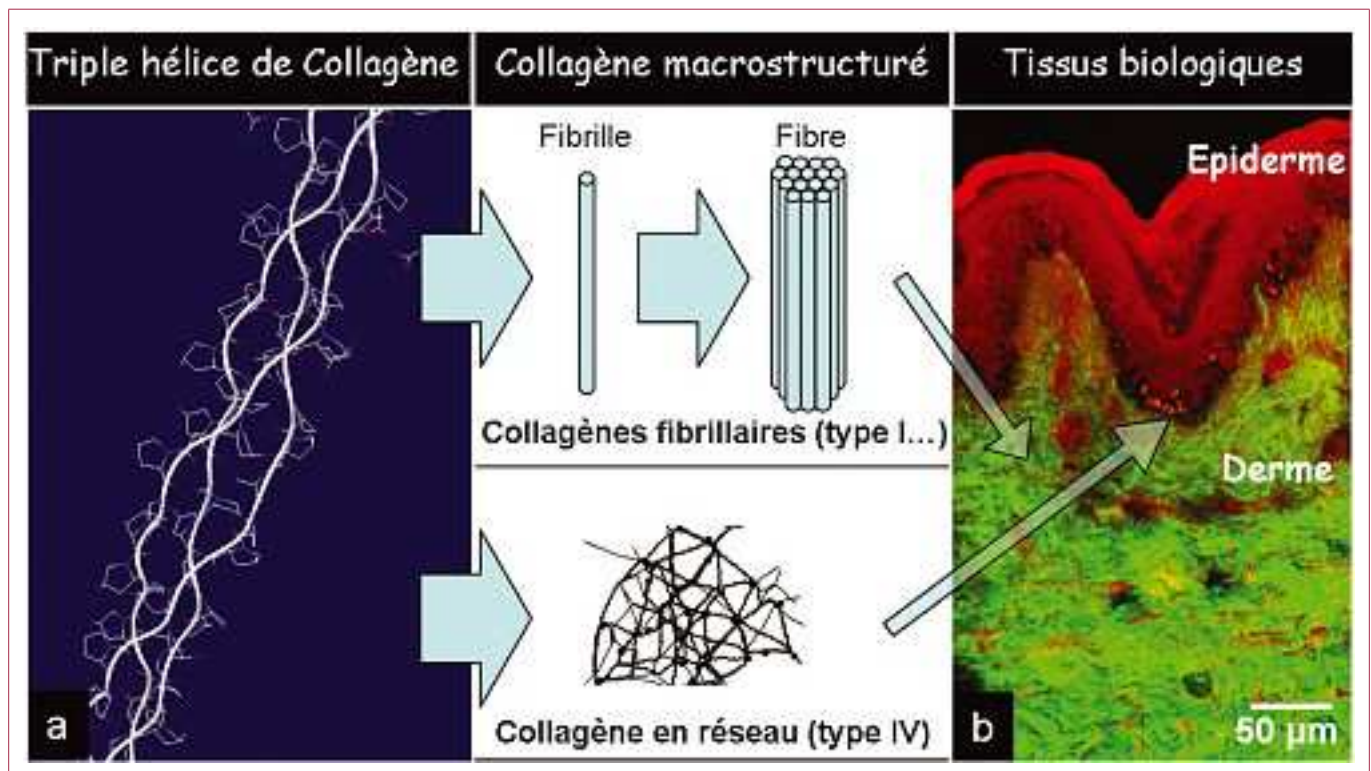
multiphoton en raison des enjeux biomédicaux majeurs liés aux processus de remodelage de la matrice extracellulaire et des limites des techniques conventionnelles. Mais c'est aussi un défi pour les physiciens car la génération de second harmonique par le collagène soulève de nombreux problèmes fondamentaux en raison de la structure très particulière de cette protéine au niveau moléculaire, de son organisation macromoléculaire hétérogène à l'échelle micrométrique, et de la nature cohérente du phénomène de génération de second harmonique. Nous allons tout d'abord aborder les aspects moléculaires de la génération de second harmonique par le collagène, avant de présenter la visualisation de son organisation dans les tissus, et les applications aux fibroses rénales.

## La génération de second harmonique par le collagène

Parmi tous les types de collagènes, les collagènes I et IV représentent 2 types essentiels d'organisation supra-moléculaire présents dans de nombreux organes (voir *figure 1*). Les molécules de collagène de type I présentent de longs domaines hélicoïdaux, et s'assemblent en fibrilles d'un diamètre de 10 à 300 nm environ, qui peuvent elles-mêmes s'assembler en fibres d'un diamètre de 0,5 à quelques microns. Ce type de collagène adopte ainsi une structure fibrillaire dans les tissus (tendons, derme,

gaine extérieure des artères, cornée, ligaments, os...). Les molécules de collagène IV, quant à elles, présentent de nombreuses interruptions de leur domaine en triple hélice. Ce type de collagène adopte ainsi une structure en réseau (mailles de l'ordre de 50 nm) et forme l'architecture des membranes dites basales, qui lient une couche de cellules jointives au tissu sous-jacent (par exemple à la jonction entre les cellules de l'épiderme et le derme dans la peau sur la *figure 1*).

Ces caractéristiques très particulières du collagène ont soulevé un débat dans la communauté scientifique quant au rôle de la conformation en triple hélice du collagène dans la génération de second harmonique et à la spécificité de ce signal en fonction du type de collagène. En effet, les différents collagènes ne présentent pas la même réponse en microscopie de second harmonique, comme le montre l'image de peau de la *figure 1* : les fibres de collagène du derme, de type I essentiellement, génèrent un fort signal SHG, alors qu'aucun signal ne provient du collagène de type IV de la membrane basale, à la jonction dermo-épidermique. Cette différence de comportement a été confirmée par l'application d'anticorps reconnaissant spécifiquement le collagène I ou IV sur une coupe mince de tissu et visualisés par un marquage fluorescent. La fluorescence révélant le collagène I présente exactement la même distribution spatiale que le signal de second harmonique, tandis que ce n'est pas le cas pour celle qui révèle le collagène IV.



**Figure 1** – Réponse optique non-linéaire de tissus collagéniques en fonction de l'organisation macromoléculaire du collagène. (a) conformation en triple hélice d'un peptide collagénique (3 chaînes polypeptidiques en hélice gauche s'enroulent en une « super hélice » droite, grâce à la présence répétitive de l'acide aminé le moins encombrant, la glycine, qui va se loger au centre de la triple hélice) et organisation macromoléculaire des collagènes de type I et IV ; (b) visualisation d'une biopsie de peau humaine par microscopie de second harmonique (vert) et fluorescence excitée à 2 photons (rouge).



## Encadré 1

Etudier les collagènes I et IV sous forme moléculaire, hors des tissus biologiques, permet de déterminer les effets liés à leur structure en triple hélice indépendamment des effets d'orientation et d'organisation macromoléculaire, et de comprendre la variation des signaux SHG selon les types de collagène.

Nous avons pour cela réalisé des expériences de réflexion de second harmonique sur des films minces isotropes de triples hélices de collagène I et de collagène IV (voir *figure E1*). Cette géométrie bidimensionnelle permet de contourner l'absence de génération de second harmonique dans une solution moléculaire (milieu isotrope à 3 dimensions), et d'isoler les composantes liées à la structure en triple hélice en jouant simplement sur les polarisations incidentes et réfléchies. En effet, la triple hélice est une molécule chirale, c'est-à-dire non superposable à son image dans un miroir, et se caractérise par une activité optique lors de son interaction avec la lumière polarisée. Cet effet bien connu en optique linéaire a son équivalent en optique non-linéaire et on doit observer une rotation de polarisation du second harmonique caractéristique de la chiralité des molécules déposées en surface. Cette rotation correspond à l'apparition de signal SHG sur la polarisation *s* alors que le signal d'un film isotrope de molécules non chirales excitées par un faisceau fondamental de polarisation *p* est lui aussi polarisé selon la direction *p*.

Les films de collagène I présentent effectivement un fort signal SHG sur la polarisation *s*, du même ordre de grandeur que celui produit sur la polarisation *p*, ce qui conduit à une

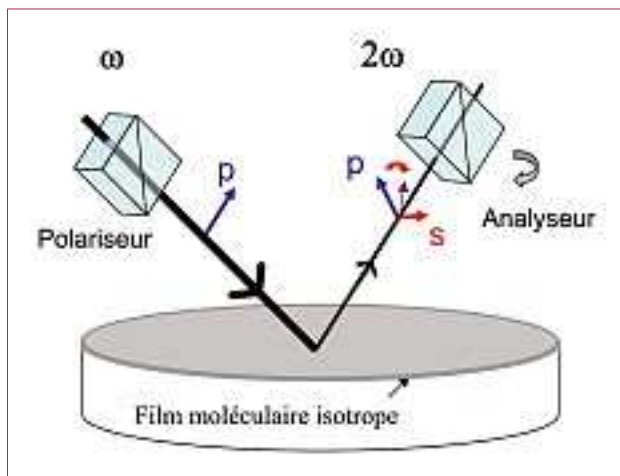


Figure E1 – Schéma de principe du dispositif expérimental.

Ce résultat est *a priori* surprenant puisque les molécules de collagène I et de collagène IV sont très semblables, excepté par la taille de leurs domaines en triple hélice. Le rôle de ce dernier point peut être estimé en mesurant l'activité optique des collagènes de type I et IV en génération de second harmonique sur des films moléculaires (voir *encadré 1*). Si des différences sont observées entre les 2 types de molécules, leur ordre de grandeur est insuffisant pour expliquer la réponse radicalement différente des 2 types de

rotation d'environ 45° (voir *figure E2*). Les composantes liées à la chiralité moléculaire représentent ainsi 50 % environ du signal SHG total des molécules de collagène I. Cette activité optique est bien supérieure à ce qui est observé en optique linéaire car la génération de second harmonique met en jeu trois photons ( $\omega + \omega \Rightarrow 2\omega$ ), ce qui permet de sonder un effet tridimensionnel tel que la chiralité avec une grande efficacité. En ce qui concerne le collagène IV, le signal sur la polarisation *p* est du même ordre de grandeur que pour le collagène I. Mais le signal sur la polarisation *s*, lié à la chiralité moléculaire, est négligeable, ce qui est sans doute lié aux nombreuses interruptions des domaines en triple hélice dans ce type de collagène. Il en résulte un signal SHG total environ 2 fois plus faible que celui du collagène I.

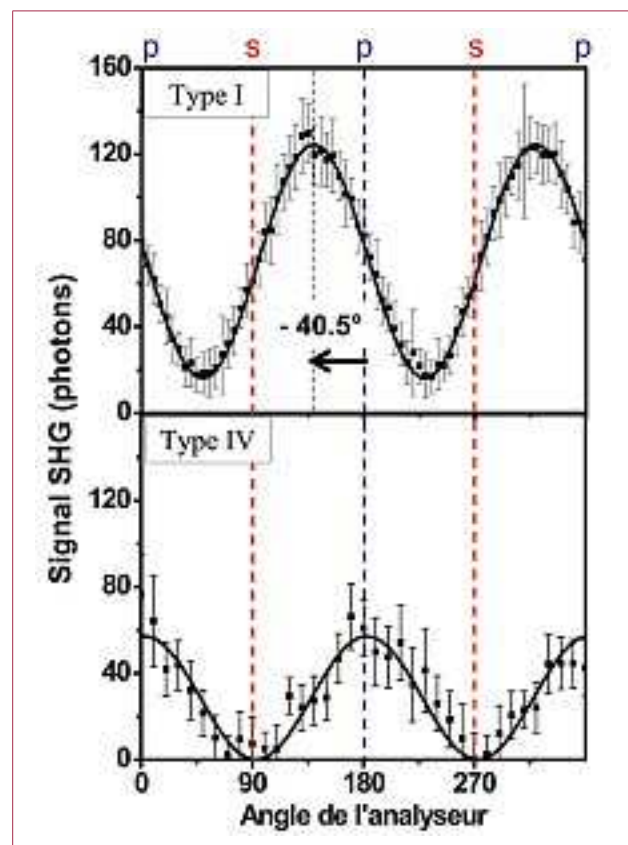


Figure E2 – Mesures de rotation de polarisation en réflexion de second harmonique sur des films moléculaires de collagène I (en haut) et IV (en bas) (excitation : 800 nm).

collagène à l'échelle d'un tissu. Il faut donc rechercher des explications non pas au niveau moléculaire mais au niveau de l'organisation macromoléculaire, tout aussi déterminante pour la génération de second harmonique. Les fibres de collagène I comprennent une forte densité de molécules bien alignées, d'où une construction cohérente efficace du signal SHG, puisque les champs rayonnés par les diverses molécules interfèrent constructivement. À l'inverse, les molécules de collagène IV sont arrangées de façon centro-



symétrique, et les champs rayonnés, en opposition de phase, s'annulent. Il ne subsiste que la partie incohérente du signal, ou diffusion Hyper-Rayleigh, trop faible pour être détectée en raison des petits volumes sondés en microscopie et de la faible densité du collagène IV. La microscopie SHG apparaît ainsi comme une sonde structurale du collagène fibrillaire.

Ceci est particulièrement intéressant pour les applications biomédicales, où il est important de distinguer les divers types de structures collagéniques. En particulier, il est plus difficile de faire régresser une accumulation pathologique de collagène fibrillaire, ou fibrose, qu'une accumulation de collagène non fibrillaire, ou sclérose, et ce sont donc les fibroses qui constituent le meilleur pronostic de gravité des pathologies fibrosantes et qu'il est essentiel de mesurer avec précision.

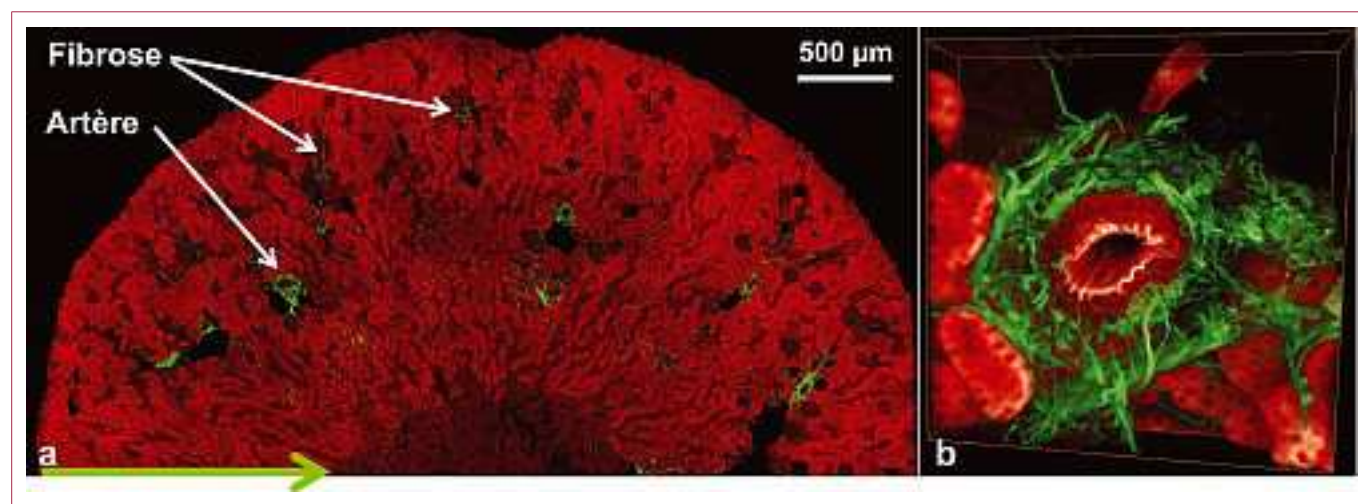
## Imagerie semi-quantitative des fibroses collagéniques

La précision d'une mesure semi-quantitative du collagène fibrillaire est liée essentiellement à la reproductibilité des conditions expérimentales et au rapport signal sur bruit. En ce qui concerne le premier point, l'utilisation du signal SHG intrinsèque du collagène fibrillaire présente l'avantage indubitable de ne pas nécessiter de coloration du tissu. Or c'est cette étape de préparation du tissu qui est délicate et limite la reproductibilité des techniques conventionnelles. Quant au rapport signal sur bruit des images SHG, il est typiquement le même que celui de la technique conventionnelle considérée comme la plus « quantitative », à savoir la coloration au Rouge Sirius visualisée en lumière polarisée. Mais les sources de bruit en microscopie SHG sont bien identifiées, et le contraste des images peut être amélioré par un algorithme adéquat.

En effet, le bruit provient essentiellement d'un fond de fluorescence lié à un léger recouvrement spectral entre les signaux de fluorescence endogènes et le canal SHG, qu'on ne peut complètement éliminer, mais qu'il est aisé de caractériser dans le tissu étudié et de soustraire au signal SHG. Le bruit est alors limité au bruit de photon qui peut cependant contribuer de façon non négligeable au signal total intégré sur une image si cette image contient peu de fibres de collagène. On tire alors avantage du fait que les fibres de collagène se caractérisent par des fréquences spatiales plus basses que celles du bruit de photons. Il est donc possible de les isoler par un algorithme de traitement d'image et d'améliorer leur visualisation spécifique. Des exemples d'images SHG corrigées, acquises sur des reins de souris fibrosés, sont présentés sur la *figure 2*.

Ces images SHG permettent d'estimer le degré de fibrose d'un tissu. Nous avons proposé plusieurs scores adaptés à différentes organisations du collagène fibrillaire (voir *encadré 2*), et appliqué cette méthodologie aux fibroses rénales et pulmonaires. La principale difficulté provient de l'hétérogénéité de la fibrose, caractéristique de ce type de maladie. Il est par conséquent nécessaire d'imager des volumes importants de tissus, tout en maintenant une résolution micrométrique adaptée à la détection de petites fibres de collagène. La grande image de rein fibrosé de la *figure 2a* est ainsi obtenue à partir d'une « mosaïque » de petites images bien résolues du type de l'*image 2b*. La mesure des scores SHG de fibrose sur ces grandes images fait alors ressortir sans ambiguïté les souris rendues malades par l'injection d'un produit connu pour ses propriétés profibrosantes, par rapport aux souris contrôles sacrifiées dans les mêmes conditions.

Mais au-delà de cette grande sensibilité, la microscopie SHG permet de visualiser la distribution tridimensionnelle des fibres de collagène *au sein du tissu*, et donc d'apprécier finement la localisation et la nature d'une



**Figure 2** – (a) rein de souris fibrosé (section coronale) imagé par microscopie de second harmonique (vert, collagène fibrillaire) et fluorescence excitée à 2 photons (rouge, fluorescence cellulaire). Taille des pixels :  $0,8 \times 0,8 \mu\text{m}$ , objectif : 20x, O.N. : 0,9, excitation : 50 mW à 860 nm. (b) reconstitution tridimensionnelle d'une zone de  $270 \mu\text{m} \times 270 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  autour d'une artère.

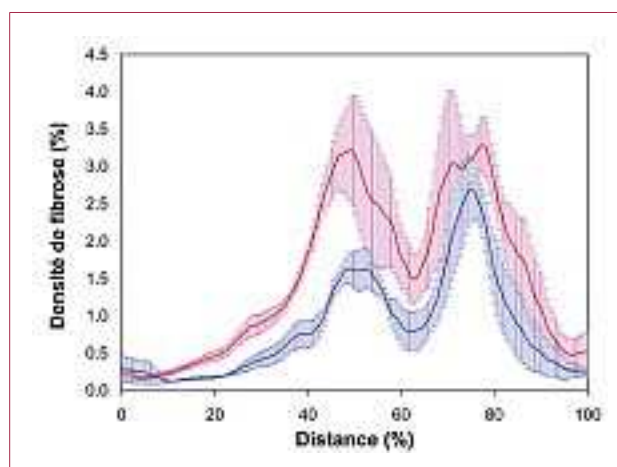


## Encadré 2

Etablir des scores quantitatifs de fibrose à partir des images SHG est un problème complexe dans la mesure où la génération de second harmonique est un processus cohérent : l'intensité du signal et sa distribution angulaire dépendent tout autant de la répartition précise des molécules de collagène dans le volume focal, hétérogène et non connu *a priori*, que de leur nombre. De plus, ce signal est imagé dans un tissu épais, et dépend donc fortement des propriétés optiques de ce tissu ; en particulier, sa collecte selon une ouverture angulaire nécessairement limitée est très sensible à la diffusion. Hormis sur des systèmes modèles, l'intensité du signal SHG ne permet donc en aucun cas de mesurer la quantité de collagène présent dans le tissu.

Il est cependant possible de comparer des tissus de même nature, en supposant que leurs propriétés optiques varient peu, et en les imageant dans les mêmes conditions. La microscopie SHG donne ainsi des résultats reproductibles dès lors que la puissance et la durée des impulsions sont maintenues constantes. On peut de plus facilement utiliser une référence pour étalonner les résultats à long terme, par exemple les fibres de collagène d'une biopsie de peau telle que celle de la [figure 1](#). Il est cependant nécessaire d'utiliser une polarisation d'excitation circulaire pour limiter les variations de signal liées à l'orientation des fibres dans le plan de l'image.

On peut alors définir des scores semi-quantitatifs permettant d'estimer le degré de fibrose d'un tissu. Le score le plus simple consiste à s'affranchir de l'intensité du signal et à compter le nombre de pixels présentant un signal SHG non nul dans une image 3D. Ce score correspond donc à une densité volumique de signal SHG, sensible à l'apparition de fibres fines, donnant peu de signal. Un deuxième score consiste à moyenner le signal SHG dans les zones présentant du signal, pour estimer l'accumulation de fibres épaisses et denses



**Figure E1** – Profil de densité SHG pour des souris contrôle (bleu, n = 3) et soumises à un traitement profibrosant (rose, n = 5), de l'extérieur vers l'intérieur du rein (voir flèche verte sur la [figure 2](#)). La fibrose résiduelle sur les souris contrôles est liée essentiellement aux artères (voir [figure 2](#)).

présentant un fort signal SHG. Enfin, le score le plus classique consiste à moyenner le signal SHG dans toute l'image pour estimer l'extension du réseau fibrillaire dans son ensemble. Ces différents scores se complètent et leur utilisation dépend de l'organisation du collagène fibrillaire dans le tissu étudié. En ce qui concerne les fibroses rénales, nous avons utilisé la symétrie cylindrique du rein et calculé ces scores en fonction de la distance à la surface extérieure du rein (voir [figure E1](#)). Nous avons alors constaté que le score de densité était le plus sensible, et mis en évidence une fibrose pathologique très légère dans la zone extérieure du rein, non détectée par les techniques conventionnelles.

fibrose, comme le montre la [figure 2](#) où la morphologie du tissu est révélée par sa fluorescence intrinsèque. On peut alors utiliser des souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente sous contrôle de gènes liés à la synthèse du collagène, ou réaliser des marquages fluorescents pour corrélérer l'accumulation des fibres de collagène avec l'activité d'enzymes d'assemblage du collagène, ou avec l'apparition d'un certain type cellulaire. Ces approches multimodales devraient s'avérer très utiles pour élucider les mécanismes de fibrose sur des modèles animaux et proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

## Perspectives

L'imagerie SHG du collagène fibrillaire ouvre donc de nombreuses perspectives pour la recherche biomédicale sur les fibroses collagéniques et plus généralement sur le remodelage de la matrice extracellulaire. Des compromis sont cependant nécessaires, notamment pour des études *in vivo*, entre la profondeur de pénétration et la sensibilité de la méthode : il est difficile de détecter des fibroses

débutantes au-delà d'une profondeur de 50  $\mu\text{m}$  dans un organe comme le rein qui est particulièrement peu transparent, même s'il est possible de visualiser des fibres plus denses ou plus épaisses à une plus grande profondeur, par exemple le derme de la peau à travers l'épiderme jusqu'à 200 à 300  $\mu\text{m}$ . Des dispositifs de correction d'aberration devraient permettre à terme d'améliorer l'imagerie en profondeur de ces signaux endogènes, qui restent cependant plus faibles que ceux des marqueurs fluorescents et ne permettront donc pas d'atteindre les mêmes profondeurs de pénétration (typiquement 500  $\mu\text{m}$ ).

L'application de la microscopie SHG au diagnostic médical dépend, quant à elle, en grande partie des progrès de l'endoscopie multiphoton, c'est-à-dire du transport des sources laser impulsives par fibres optiques et de l'implémentation de dispositifs de balayage miniaturisés. Mais dès à présent, la capacité de la microscopie SHG à distinguer spécifiquement les collagènes fibrillaires des composantes non fibrillaires de la matrice extracellulaire, et la précision des mesures semi-quantitatives qui en découlent, pourraient améliorer le diagnostic de certaines pathologies fibrosantes et la prise en charge des patients.



**POUR EN SAVOIR PLUS**

Hulmes (D.J.S.), « Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures », *J. Struct. Biol.*, 137, 2002, 2-10.

Freund (I.), Deutsch (M.), Sprecher (A.), « Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation and small-angle scattering in rat-tail tendon », *Biophys. J.*, 50, 1986, 693-712.

Pena (A.-M.), Boulesteix (T.), Dartigalongue (T.), Schanne-Klein (M.-C.), « Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV », *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2005, 10314-10322.

Strupler (M.), Pena (A.-M.), Hernest (M.), Tharaux (P.-L.), Martin (J.-L.), Beaurepaire (E.) and Schanne-Klein (M.-C.), « Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues », *Opt. Express*, 15, 2007, 4054-4065.

Williams (R.M.), Zipfel (W.R.) Webb (W.W.), « Interpreting second-harmonic generation images of collagen fibrils », *Biophys. J.*, 88, 2005, 1377-1386.

Ont aussi participé activement à ce travail Ana-Maria Pena, Monica Hernest, Thierry Boulesteix, Jean-Louis Martin et Emmanuel Beaurepaire du Laboratoire d'Optique et Biosciences (Ecole Polytechnique, CNRS UMR7645, U696 Inserm), et Pierre-Louis Tharaux du Centre de Recherche Cardiovasculaire Inserm Lariboisière (Inserm U689).